

Attorney Docket # 3029-7



COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

#2 / 62  
MW Patent

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of

Yasuhiro SAKAI et al.

Serial No.: 10/005,753

Filed: October 29, 2001

For: Method of Staining, and Detecting and  
Counting Bacteria, and a Diluent for Bacterial  
Stain

Examiner: Not Yet Assigned  
Group Art: Not Yet Assigned

I hereby certify that this correspondence is being  
deposited with the United States Postal Service with  
sufficient postage as first class mail in an envelope  
addressed to: Assistant Commissioner for Patents,  
Washington, D.C. 20231, on

January 14, 2002

(Date of Deposit)

Lance J. Lieberman

Name of applicant, assignee or registered representative

Signature

January 14, 2002

Date of Signature

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

RECEIVE

FEB 07 2002

LETTER TRANSMITTING PRIORITY DOCUMENT TECH CENTER 1600

In order to complete the claim to priority in the above-identified application under  
35 U.S.C. §119, enclosed herewith is a certified copy of each foreign application on which the claim  
of priority is based: Japan on November 01, 2000, No. 2000-334641.

Respectfully submitted,

COHEN, PONTANI, LIEBERMAN & PAVANE

By

Lance J. Lieberman  
Reg. No. 28,437  
551 Fifth Avenue, Suite 1210  
New York, N.Y. 10176  
(212) 687-2770

January 14, 2002



日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2000年11月 1日

出願番号  
Application Number:

特願2000-334641

出願人  
Applicant(s):

シスメックス株式会社

RECEIVED

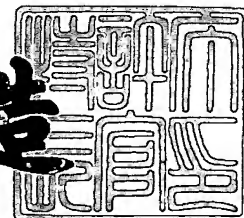
FEB 07 2002

TECH CENTER 1600/2900

2001年12月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3108775

【書類名】 特許願  
【整理番号】 00-044JP  
【提出日】 平成12年11月 1日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/48  
【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 酒井 康裕

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 河島 康之

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 井上 淳也

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 池内 喜郎

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088867

【弁理士】

【氏名又は名称】 西野 卓嗣

特 2 0 0 0 - 3 3 4 6 4 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059617

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9723350

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌の染色方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 亜硝酸イオンを還元可能な物質の存在下で、ポリメチン系色素を作用させることを特徴とする細菌の染色方法。

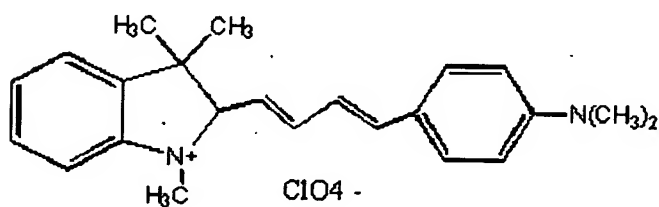
【請求項2】 前記亜硝酸イオンを還元可能な物質が、アスコルビン酸またはその塩、イソアスコルビン酸またはその塩、スルファミン酸、スルファニル酸、スルファニルアミド、アミノメタン、アミノメタンスルホン酸、アミノエタンスルホン酸、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、メチオニン、グルタチオン、システイン、メルカプトエタノール、メルカプト酢酸、チオフェノール、3-メルカプトプロピオン酸、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、塩酸ヒドロキシルアミン、ホスフィン酸ナトリウム、及び尿素からなる群より選択される請求項1記載の細菌の染色方法。

【請求項3】 前記ポリメチン系色素が、以下の群から選択される少なくとも1つである請求項1記載の細菌の染色方法。；

(1) チアゾールオレンジ

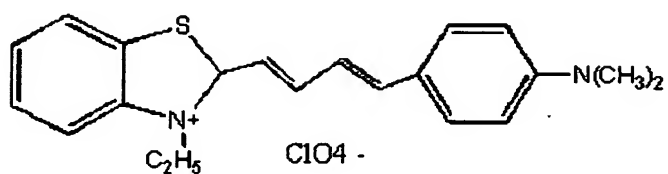
(2)

【化1】



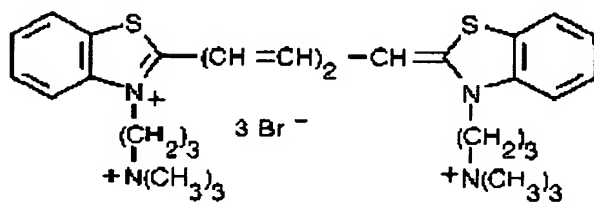
(3)

【化 2】



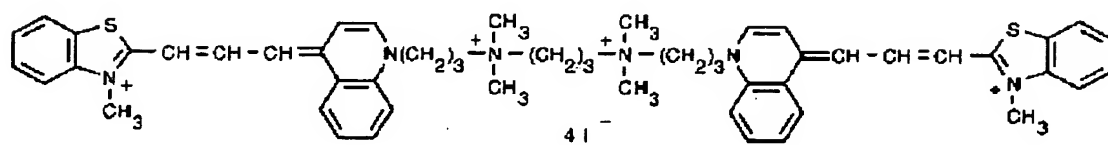
(4)

【化 3】



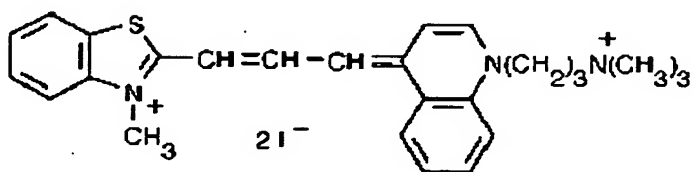
(5)

【化 4】



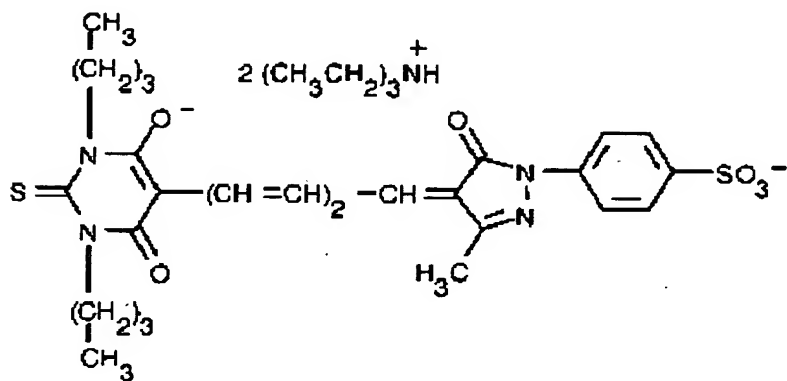
(6)

【化 5】



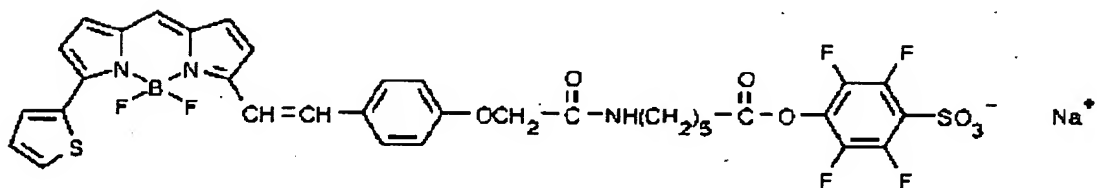
(7)

【化6】



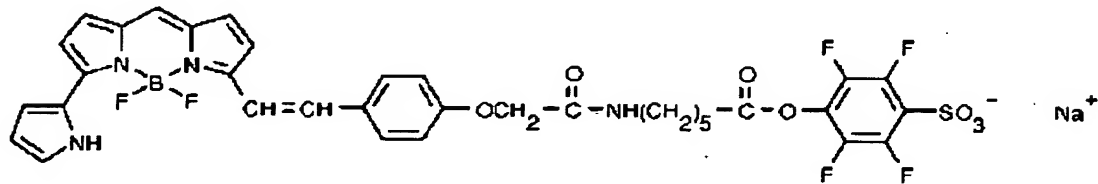
(8)

【化7】



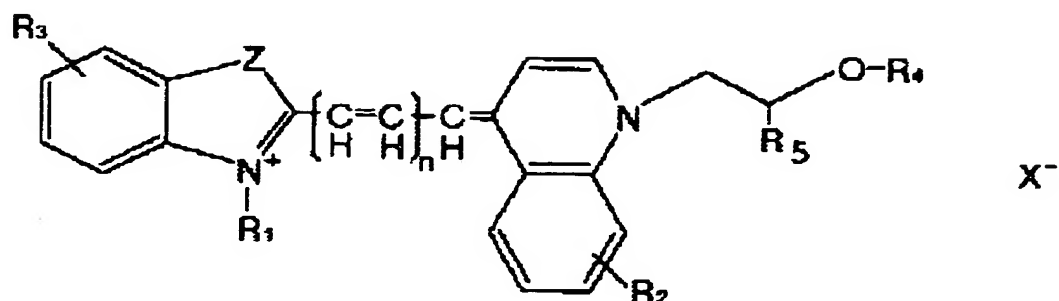
(9)

【化8】



(10) 以下の一般式で表される化合物：

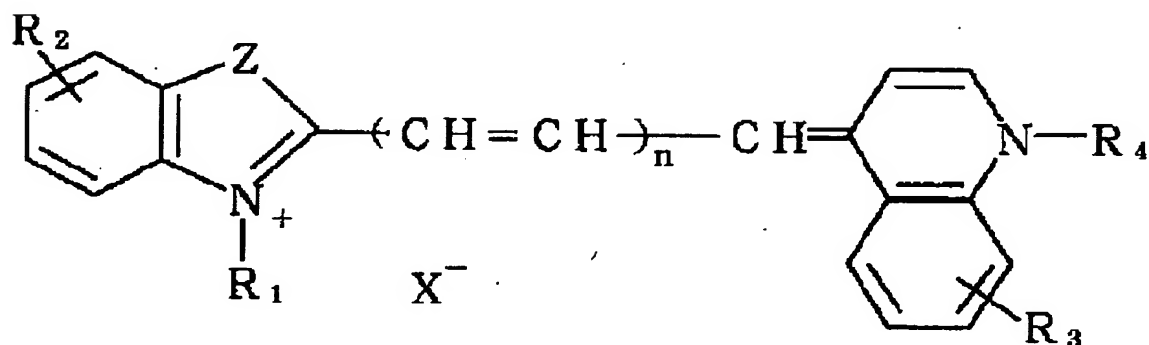
【化9】



(式中、R1は水素原子又は炭素数1～3のアルキル基；R2及びR3は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R4は水素原子、アシル基又は炭素数1～3のアルキル基；R5は水素原子、置換されていてもよい炭素数1～3のアルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子又は炭素数1～3のアルキル基で置換された炭素原子；nは1又は2；X-はアニオンである)

(11) 以下の一般式で表される化合物：

【化10】



(式中、R1は水素原子又は炭素数1～18のアルキル基；R2及びR3は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R4は水素原子、アシル基、又は炭素数1～18のアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは炭素数1～3のアルキル基を有する炭素であり；nは0,1又は2であり；X-はアニオンである)。



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床試料中の細菌、とくに好適には尿試料中に存在する細菌の染色方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

尿中細菌数は感染の有無を判定する上で臨床診断上、重要なパラメーターである。一般的に、尿路感染症(Urinary Tract Infection)の判定基準として、尿中細菌数が105個/ml以上出現した場合を陽性とする。また103個/ml以下では汚染尿(常在菌)であるとして陰性としている。104個/ml程度の場合は判定保留域であるが、再検領域とする場合が多い。

【0003】

従来から行われている尿中細菌の確認方法としては、グラム染色した後顕微鏡下で確認する、無染色で顕微鏡下で確認する、蛍光染色した後顕微鏡下で確認する、といった方法などが挙げられる。

【0004】

尿中には夾雑物と言われる臨床上有用ではない粘液糸、結晶、無晶性塩類、細胞の断片がしばしばみられこれらが重要な測定粒子(特に細菌)の妨害となり、細菌数を正確に計数することは困難であった。現実的には $10^4$ 個/ml程度の菌数を精度良く計数する方法は存在しなかった。

【0005】

例えば、グラム染色は、細菌と夾雑物が同時に染色されるため、顕微鏡下において数の少ない細菌の見落としが多い。また染色工程が複数あり、染色に時間を要する(約15分)ため、作業効率が悪かった。

【0006】

また、無染色鏡検は、方法としては迅速であるが、特に球菌状の夾雑物が出現した場合には菌との弁別が不可能である。

【0007】

蛍光染色鏡検については、細菌検出性能は上記二つの方法よりも高いが、細菌以外の夾雑物が混入した場合に、それらを効果的に除去し、さらに細菌を迅速に染色する方法については開示されていない。

【 0 0 0 8 】

なお、標準法である寒天培地法の場合は、菌数の測定に 1 6 時間以上要し、迅速とは言い難い。

【 0 0 0 9 】

なお、米国特許第 4, 6 2 2, 2 9 8 号、特開平 9 - 1 1 9 9 2 6 号および特開平 9 - 3 2 9 5 9 6 号には蛍光染色された尿試料をフローサイトメータで測定し細菌を検出する方法が提案されている。また、蛍光染色にはポリメチン系色素が使用されている。

【 0 0 1 0 】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、細菌を染色するのにポリメチン系色素を用いた場合、細菌が十分に染色されない場合がある。硝酸還元能力のある細菌が増殖して亜硝酸塩を多量に生産しているような試料の場合、亜硝酸イオンがポリメチン系色素を分解してしまい、細菌の染色のために有効に作用しない。

【 0 0 1 1 】

とくに、酸性 pH においては、細菌が良く染色され、また尿試料のように粘液系が共存する場合はその影響を少なくすることができるが、亜硝酸イオンによる影響は、酸性 pH において顕著である。

【 0 0 1 2 】

本発明は、試料中に亜硝酸イオンが高濃度で存在しても、細菌を迅速に効率よく検出できるような染色方法を提供することを目的とする。

【 0 0 1 3 】

【課題を解決するための手段】

本発明の細菌染色方法は、亜硝酸イオンを還元可能な物質の存在下で、ポリメチン系色素を作用させることからなる。

【 0 0 1 4 】

## 【発明の実施の形態】

本発明を実施する際、試料は細菌を含むものであれば特に制限されないが、特に尿試料において有効である。

## 【0015】

亜硝酸イオンを還元可能な物質としては、例えば、アスコルビン酸またはその塩、イソアスコルビン酸またはその塩、スルファミン酸、スルファニル酸、スルファニルアミド、アミノメタン、アミノメタンスルホン酸、アミノエタンスルホン酸、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、メチオニン、グルタチオン、システイン、メルカプトエタノール、メルカプト酢酸、チオフェノール、3-メルカプトプロピオン酸、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、塩酸ヒドロキシルアミン、ホスフィン酸ナトリウム、及び尿素からなる群より一種またはそれ以上の物質を組み合わせる選択することができる。濃度の目安としては、試料を希釈するための希釈液中で、10 mM以上の濃度で利用できるが、好ましくは、アスコルビン酸の場合では、85～115 mM、スルファミン酸では40～200 mM、システイン、グルタチオン及び亜硫酸ナトリウムでは10～50 mM、尿素では0.5 M以上が好適である。ただし、尿素は濃度が高すぎると細胞の変性が起こる可能性があるため好ましくない。一般に、硝酸還元細菌 $10^5$ 個/ml存在下で、亜硝酸イオンが0.06 mg/ml産生されるといわれている。また、一般に細菌の増殖は、 $10^8 \sim 10^9$ 個/mlで上限となり、それ以上に増殖しない（できない）といわれている。そのため、 $10^5 \sim 10^8$ 個/mlの細菌が産生する亜硝酸イオンを還元できる量が好ましい。

## 【0016】

本発明の細菌染色方法において、染色時のpHは細菌が染色されるpHであれば特に制限されないが、試料が尿試料の場合、染色時のpHを酸性にすることで、（1）細菌が中性やアルカリ性よりも良く染色されること、（2）粘液系の非特異染色を抑え、かつ粘液系をある程度溶解させることができるので有利である。

## 【0017】

酸性を維持するために、酸あるいは  $pK_a$  1～5 の緩衝剤を使用することができる。好ましくは pH2.0～3.0 を維持できるものであれば緩衝剤としては特に限定されないが、好適には、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、 $\beta$ -アラニン、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸及びフマル酸などが使用できる。使用量は、前記 pH 範囲を維持できる量で使用でき、10～500 mM の範囲で好適に使用できる。

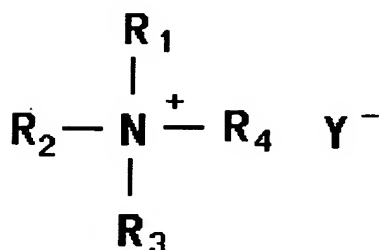
## 【0018】

また、細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を添加すると、細菌の細胞膜が傷害され、色素が入り込みやすくなるので好ましい。その結果、細菌の細胞内の物質と色素とが効率よく結合して細菌がよく染色され、夾雑物と弁別しやすくなる。一方、粘液糸や赤血球や細胞の破片などは、溶解あるいは収縮し、細菌の検出への影響が低減されることとなる。

## 【0019】

カチオン性界面活性剤はとくに限定されないが、好適には以下の式で示される四級アンモニウム塩；

## 【化11】



(式中、 $R_1$  は炭素数 8～18 のアルキル基； $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  は同一又は異なって、炭素数 1～3 のアルキル基またはベンジル基； $Y^-$  はハロゲンイオンである) が使用できる。

## 【0020】

例えば、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩が好適に使用される。使用量

については、10～30000mg/l、好ましくは100～3000mg/lが好適である。

【0021】

色素については、細菌を染色できるものであれば特に制限されないが、試料が尿試料の場合には上述の理由により、酸性域で細菌を染色できるものが好ましい。濃度については、色素ごとに好適な濃度は異なるが、例えば、0.1～100ppm（最終濃度）の範囲で使用できる。なお、細菌の検出能力の点から、使用する色素は、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素を使うのが有利である。この点で、ポリメチン系色素が好ましく、例えば、以下の（1）～（11）の色素が使用できる。

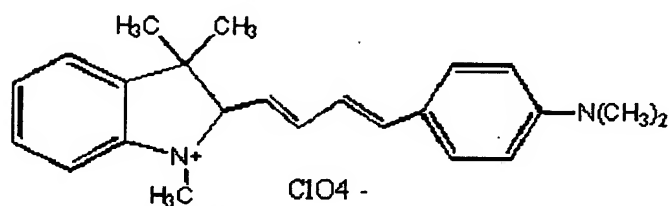
【0022】

（1）チアゾールオレンジ

【0023】

（2）

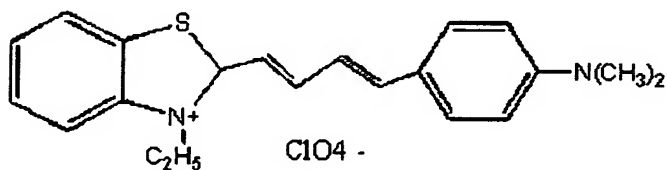
【化12】



【0024】

（3）

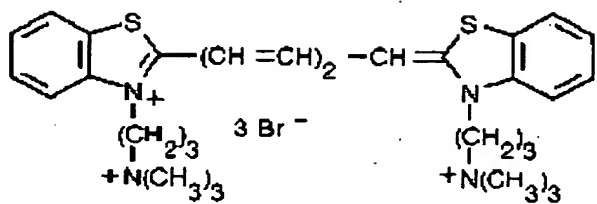
【化13】



【0025】

(4)

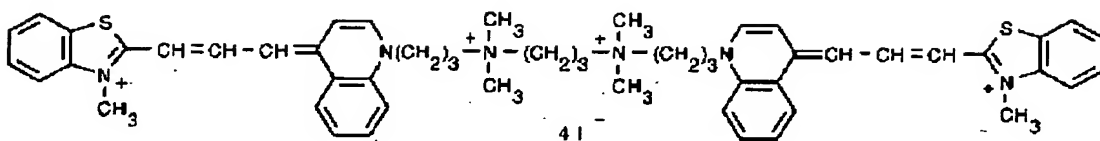
【化 14】



【0026】

(5)

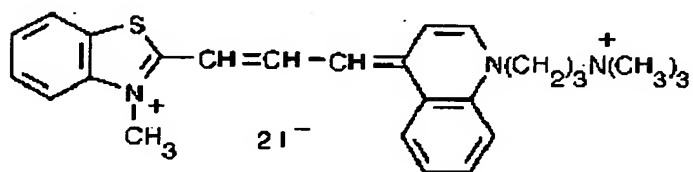
【化 15】



【0027】

(6)

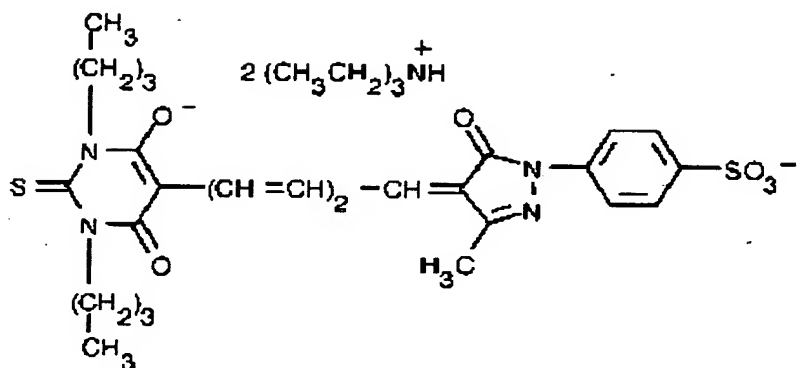
【化 16】



【0028】

(7)

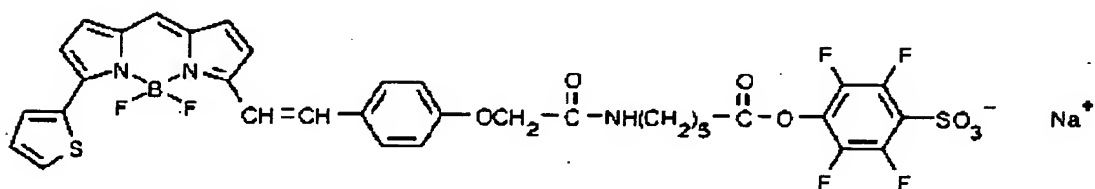
【化 17】



【0029】

(8)

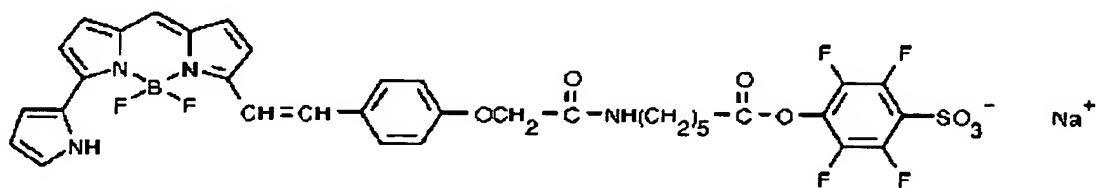
【化 18】



【0030】

(9)

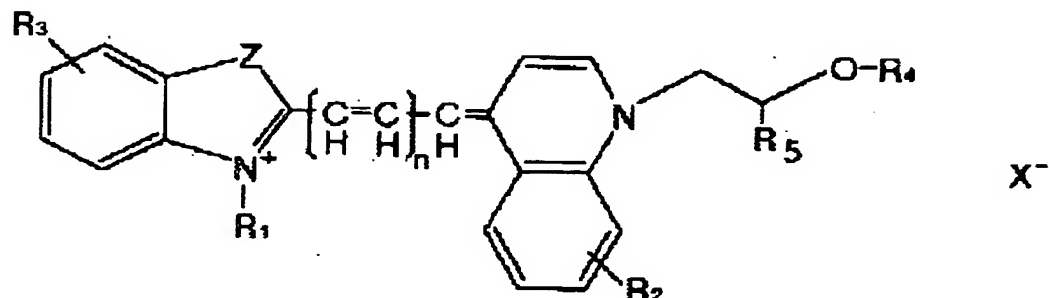
【化 19】



【0031】

(10) 以下の一般式で表される化合物：

【化20】

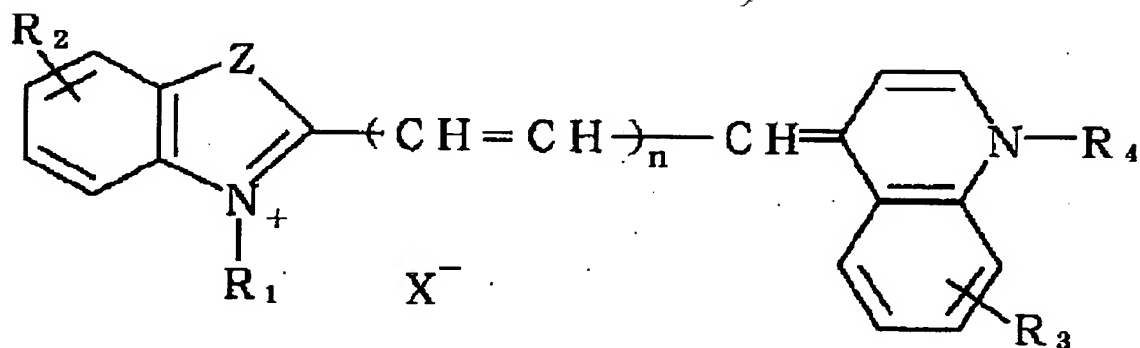


(式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は炭素数1～3のアルキル基；R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R<sub>4</sub>は水素原子、アシル基又は炭素数1～3のアルキル基；R<sub>5</sub>は水素原子、置換されていてもよい炭素数1～3のアルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子又は炭素数1～3のアルキル基で置換された炭素原子；nは1又は2；X<sup>-</sup>はアニオンである)

【0032】

(11) 以下の一般式で表される化合物：

【化21】



(式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は炭素数1～18のアルキル基；R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R<sub>4</sub>は水素原子、アシル基、又は炭素数1～18のアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは炭素数1～3のアルキル基を有する炭素であり；nは0,1又は2であり；X<sup>-</sup>はア



ニオンである)。

【0033】

これらの色素のうち、(1)は市販品を入手できる。(2)、(3)は日本感光色素研究所(株)より入手できる。(5)～(9)は、Molecular Probes, Inc.より入手できる。

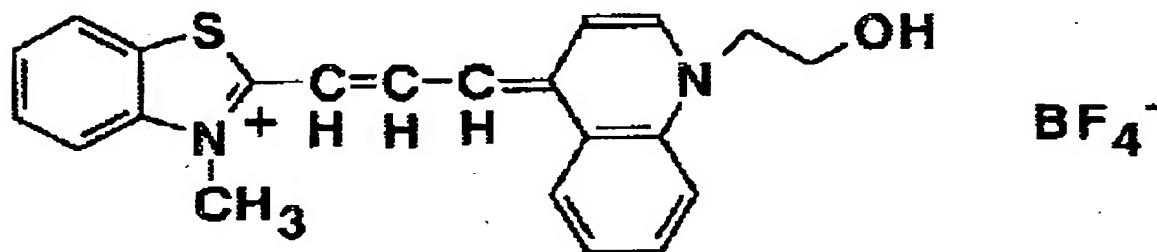
【0034】

また、(10)は、特開平9-104683号に、(11)は、特開平10-319010号に製造方法が記載されている。

【0035】

なお、(10)の一般式で示される色素のうち、特に、次の色素；

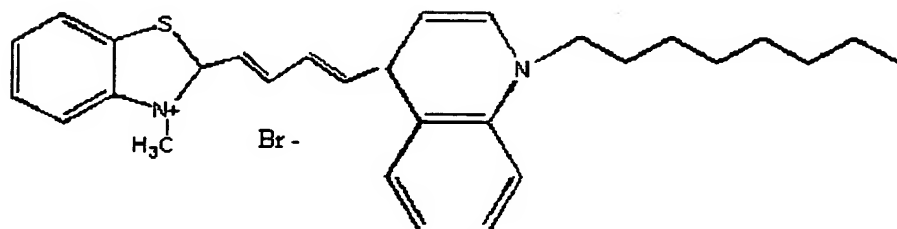
## 【化 2 2】



【0036】

また、(11)の一般式で示される色素のうち、特に次の色素；

【化 2 3】



が好適である。

【 0 0 3 7 】

さらに、試料が尿試料の場合、硫酸塩または硝酸塩のうちいずれかの無機塩の共存下で染色を行うことで、細菌の蛍光染色性を増大させ、夾雑物の非特異染色を抑制することができるので好ましい。使用量としては、10～500mM、好ましくは50～200mMの濃度範囲で使用できる。

【 0 0 3 8 】

本発明の染色法では、試料中に、硝酸還元力を持ち亜硝酸を産生する細菌、例えば、*Staphyrococcus aureus*のような腸内菌、*E.coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp.などのグラム陰性通性桿菌が多量に存在している場合に好適に染色される。また、尿試料に限らず、血液、髄液など他の臨床試料にも適用できる。

【 0 0 3 9 】

本発明の染色法は、試料、亜硝酸イオンを還元可能な物質を含む水溶液、色素を含む溶液を混合することで実施できる。なお、色素は亜硝酸イオンを還元可能な物質を含む水溶液中に含有させてもよいが、使用する色素が水溶液中では不安定な場合には、色素をメタノール、エタノールやエチレングリコールなどの水溶性有機溶媒中に溶解しておき、使用時に亜硝酸イオンを還元可能な物質を含む水溶液と混合するようにしておけば、色素の保存安定性を向上させることができる。

【 0 0 4 0 】

反応温度・時間は特に限定されないが、温度は、15～50℃、時間は、混合直後から15分間で実施できる。

【 0 0 4 1 】

本発明の染色法により染色された試料は、顕微鏡や画像認識装置で観察して細菌を検出することもできるが、フローサイトメトリによって細菌を高精度で検出・計数することができる。

【 0 0 4 2 】

すなわち、①細菌を含む試料を、亜硝酸イオンを還元可能な物質を含む水溶液で希釈し、  
②該試料をポリメチン系蛍光色素を用いて一定時間染色反応させ、  
③前記工程で処理された試料をフローサイトメータの検出部に導入し、染色され

た細菌の細胞一つ一つに光を照射し、該細胞から発せられる散乱光及び蛍光を測定し、

④測定した散乱光及び蛍光の信号強度または、粒子の長さを反映するパルス幅に基づいて細菌と他の成分を分離・計数することによって細菌を検出することができる。

#### 【 0 0 4 3 】

とくに試料が尿試料の場合、細菌以外に様々な成分が共存するため、そのような場合に細菌と他の成分を分離・計数するには、測定によって得られた信号を組み合わせて行うことができる。信号の組み合わせとして例えば、前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅、前方散乱光強度と蛍光強度、前方散乱光パルス幅と蛍光強度の組み合わせが挙げられる。好適には、例えばまず前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅の組み合わせで2次元分布図（スキャッタグラム）を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行い、主に粘液糸を分離し、さらに、ゲーティングされた集団に対して、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで、さらに2次元分布図を作成し、蛍光強度の違いから細菌と他の成分（結晶や細胞の破片など）を分離する。概念図を図4に示す。なお、試料中に細菌のみが含まれる場合には、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで2次元分布図を作成し、細菌を計数することができる。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 【実施例】

以下に好適な実施例を示すが、本発明はこれに限定されない。

##### 実施例 1

##### 試薬組成

（希釈液）

クエン酸	92.3mM
水酸化ナトリウム	0.75g/l
	(pH2.5になる量)
テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド	0.1%(w/v)
硫酸ナトリウム	9 0 mM

アスコルビン酸

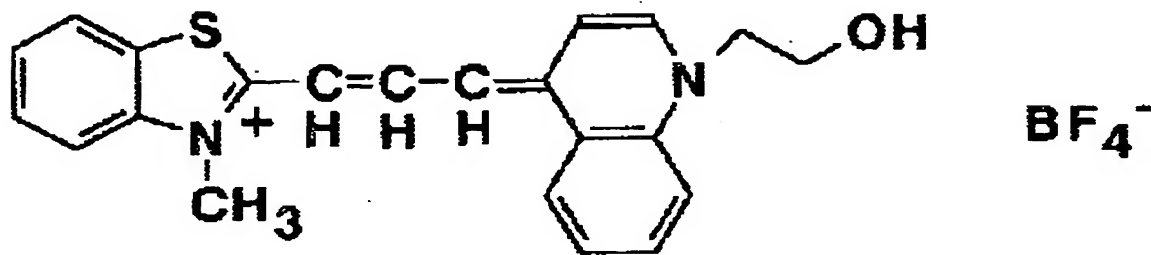
85 mM

(染色液)

色素A (以下の構造式)

40ppm (エチレングリコール溶液)

【化24】



【0045】

亜硝酸イオンを多量に含む試料（細菌濃度 $5.0 \times 10^6$ 個/ml；病院尿）140  $\mu$ l に、上記組成の希釈液952  $\mu$ l及び染色液を色素Aの最終濃度が1ppmになるように添加し、40℃、20秒間反応させ、赤色半導体レーザーを光源とするフローサイトメータで散乱光及び蛍光の測定を行い（分析尿量8.0  $\mu$ l）、横軸に蛍光強度を、縦軸に前方散乱光強度をとって二次元分布図（スキャッタグラム）を作成した。結果を図1に示す。対照として、アスコルビン酸を含まない試薬を用いて測定を行った（図2）。

【0046】

アスコルビン酸を含まない試薬を用いた場合には、細菌が染色されず、蛍光強度が0であったのに対し、アスコルビン酸を添加した場合には、細菌が染色され、検出できることが確認できた。

【0047】

実施例2

上記実施例の希釈液において、アスコルビン酸の代わりにスルファミン酸100 mMを用いて、同様の測定を行った。結果を図3に示す。実施例1と同様に細菌が染色され検出できることが確認された。

【0048】

【発明の効果】

本発明の細菌の染色方法によれば、亜硝酸イオンを還元できる物質を添加したので、試料中で、硝酸還元力のある細菌が亜硝酸イオンを産生していてもその影響を受けることなく、細菌を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例 1 において、還元剤としてアスコルビン酸を使用した場合の蛍光強度－前方散乱光強度のスクアッタグラムである。

【図 2】

本発明の実施例 1 において、還元剤を含まない場合の蛍光強度－前方散乱光強度のスクアッタグラムである。

【図 3】

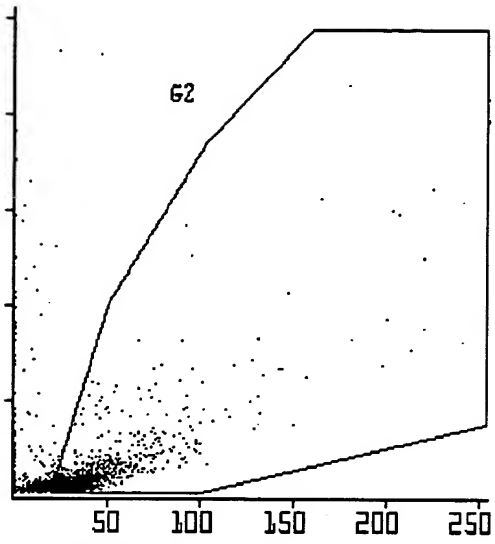
本発明の実施例 2 において、還元剤としてスルファミン酸を使用した場合の蛍光強度－前方散乱光強度のスクアッタグラムである。

【図 4】

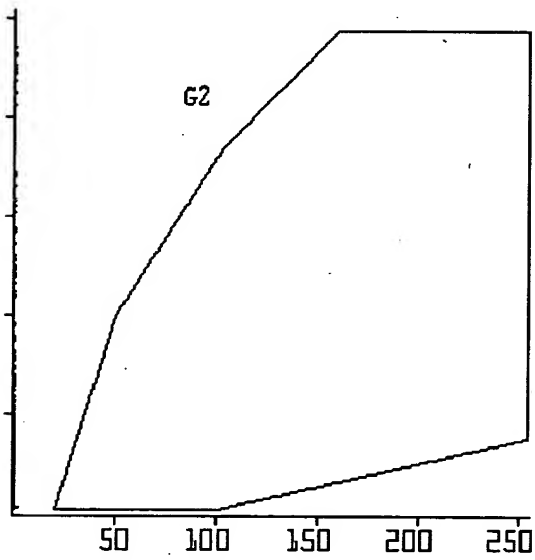
本発明の細菌染色法を実施後、細菌を分離・計数する方法を表した概念図である。

【書類名】 図面

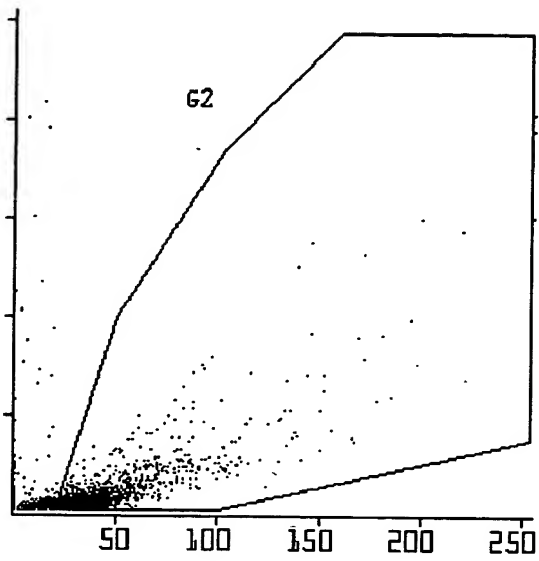
【図 1】



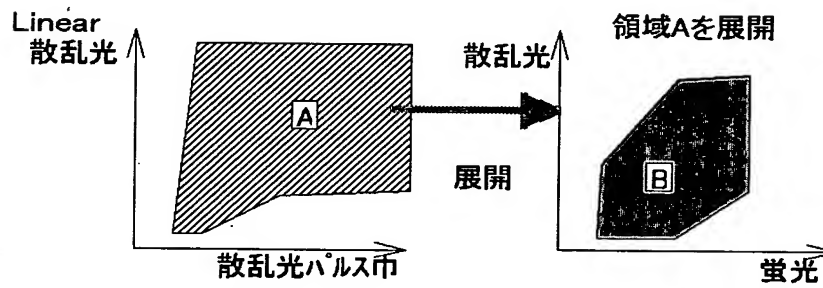
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】            要約書

【要約】

【課題】    試料中に亜硝酸イオンが高濃度で存在しても、細菌を迅速に効率よく検出できるような染色方法を提供する。

【解決手段】    亜硝酸イオンを還元可能な物質の存在下で、ポリメチン系色素を作用させて細菌を染色する。

【選択図】            図 1



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日	1998年10月 7日
[変更理由]	名称変更
住 所	神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
氏 名	シスメックス株式会社